

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 19 日現在

機関番号：12605

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K13998

研究課題名(和文)汎用RGB センサーを用いた分光計測法による作物の乾燥耐性評価システムの開発

研究課題名(英文)Development of imaging system using RGB sensor to evaluate drought tolerance of plants

研究代表者

梅澤 泰史 (Umezawa, Taishi)

東京農工大学・(連合)農学研究科(研究院)・准教授

研究者番号：70342756

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：植物の生育は様々な環境要因によって左右されるため、生産現場等で植物の状態を迅速・簡便・広範囲にモニタリングできる技術が必要である。本課題では、3チャンネルRGB画像を用いて撮影対象のスペクトル情報をピクセル毎に推定し、多波長分光画像を再構成する方式によって、低コストかつ簡便に植物のストレス状態をモニタリングする技術を確立する。代表的なマメ科植物であるダイズの葉を用いて計測を行ったところ、乾燥条件で等価散乱係数スペクトルの値が増加した。したがって、本方式により得られる光散乱スペクトル画像を利用することで、植物の環境応答を非破壊かつ迅速に評価できる可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：Agricultural production is limited by various factors, for example drought, temperature and CO2 elevation etc. In this study, we aimed to develop an imaging system to evaluate stress responses of plants. We used 3ch RGB sensors and recalculated for each spectral range. We measured such data using soybean leaves subjected to drought stress. As a result, there were significant differences of scattering coefficient spectrum between normal and drought stressed soybean leaves. This suggests that our method could be potentially useful to evaluate quickly plant's stress responses.

研究分野：植物分子生物学

キーワード：乾燥耐性 分光計測法 ハイパースペクトルイメージング ダイズ

1. 研究開始当初の背景

近年、地球環境の変動によって干ばつや砂漠化の問題が進行している。植物の生育は、乾燥や塩分、温度などの環境ストレスによって著しく阻害されるため、農業生産への影響は深刻である。一般に、植物が環境ストレスを受けると、組織、細胞、および遺伝子レベルでダイナミックな変化が起こる。また、その変化も初期応答から、長期にわたる応答まで様々である。こうした変化は、植物の外観に可視的に現れることもあれば、内部の変化にとどまる場合もあることから、植物の環境応答を客観的に評価することは難しく、研究の律速となっていた。

2. 研究の目的

ハイパースペクトルイメージングはスペクトル情報を撮像素子のピクセル毎に取得する方法であり、多数の分光画像を短時間で取得することが可能である。この技術を利用して、植物のストレス状態をモニターする試みは早くから行われており、特に近赤外領域において植物の水分状態を推定できることから、植物の乾燥ストレス状態や耐性評価の新しい指標として期待されている。しかし、計測機器が高価となることや、専門的な知識が必要なことから広く一般に普及するには至っていない。申請者らの先行研究では、これまでに低コストな汎用 RGB カメラと Wiener 推定法に基づくハイパースペクトルイメージングシステムを構築した(図1)。また、このシステムを用いてシロイヌナズナを用いたモデル実験により、植物の環境ストレス負荷による分光反射特性の時空間変化のイメージングに成功した。これにより、可視から近赤外波長域を対象にすることで、植物表面に現れる外的変化と見た目ではわからない内的変化を同時かつ広範囲に画像としてモニターできる可能性が得られた。本研究課題では、これまでの研究成果を基に、計測対象をシロイヌナズナから一般の作物に拡大し、技術の汎用化を図る。また、植物の機能的変化(クロロフィル量と水分量)および形態学的変化(細胞サイズと細胞密度)と実際の環境応答との関連を調べることで、植物ストレス耐性評価システムのさらなる高機能化を目指す。

3. 研究の方法

研究代表者は、これまでにモデル植物であるシロイヌナズナを用いて環境応答機構の研究を長年にわたって継続してきた。しかし、モデル植物の研究成果は、実際の作物種に展開することで実用化への道が開けるものである。そこで、本研究ではモデル植物ではなく作物種を用いて画像解析を行うこととした。当初の計画では、世界の主要作物であるイネ、トウモロコシおよびダイズの計測を想定していたが、栽培環境の制約によりダイズを主な解析対象とした。ダイズはタンパク含

量が高く、油料作物、飼料用作物としての利用価値も高いため、近年収量が世界的に増加している作物の一つでとなっている。また、根粒菌の共生による窒素固定という他にない特徴も備えている。本研究では、ダイズの栽培環境を整備し、通常条件で栽培したものと、乾燥ストレスを与えた植物を用意して、画像解析に用いた。

RGB カラー CCD カメラ (35 万画素、RGB 各 8-bit)、ビデオズームレンズ、画像解析処理用 PC、光学除振台から成るハイパースペクトルイメージングシステムを構築した。光源に関しては白色 LED 光源と、既存の近赤外 LED 光源を 2 分岐ライトガイドで接続することで、400 ~ 800nm の波長範囲をカバーする合成光源装置を新たに構築した。RGB カメラに内蔵されている IR カットフィルターを除去することで、近赤外域の感度を確保した。このシステムを用いて、これまでに乾燥ストレス処理したシロイヌナズナ植物を計測し、良好な結果を得ている。Wiener 推定法により R、G、B の 3 応答量から分光拡散反射率を求めるための推定行列 (Wiener 推定行列) はこれまでに作成したのもも利用可能であるが、推定精度の向上を図るために、新たに収集する分光反射率データを併せて Wiener 推定行列を更新し、本研究課題で構築したイメージングシステムに実装した。推定された分光反射率から植物内の機能的変化および形態学的変化を定量化するために、光伝搬モンテカルロシミュレーションに基づき、クロロフィル量と光散乱パラメーターの推定式を作成し、吸収係数と等価散乱係数のスペクトル画像を推定した。

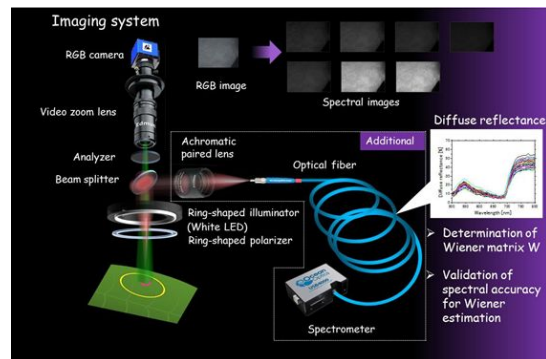
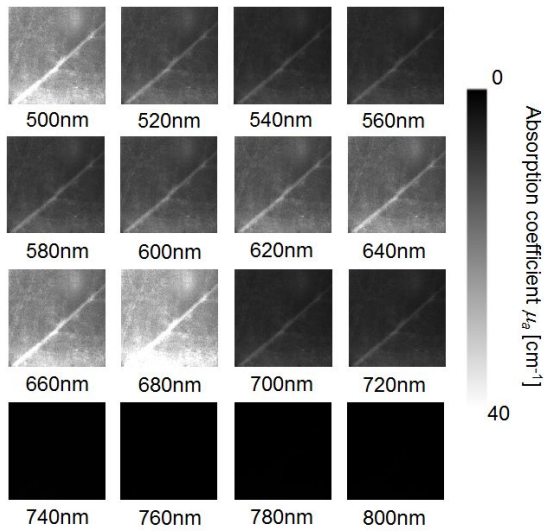


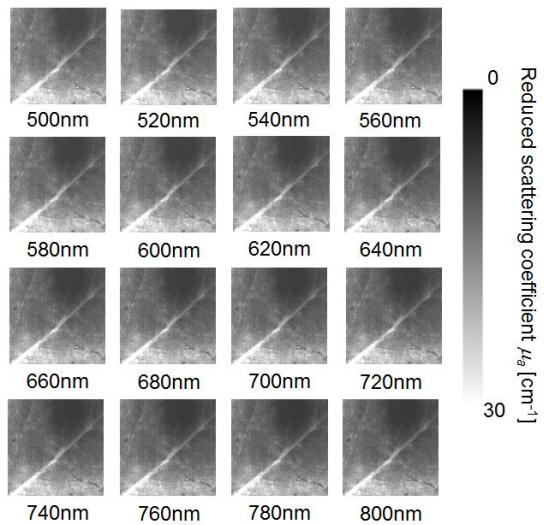
図1. 計測システム

4. 研究成果

推定した吸収係数と等価散乱係数画像の一例を図2に示す。また、吸収係数と等価散乱係数のスペクトル画像に関心領域 (Region of interest, ROI) を設定し、領域平均値をグラフ化した結果を図3に示す。吸収係数画像の波長依存性を見ると、クロロフィルの吸収スペクトルを反映しており、680nm あたりに吸収ピークをもっていることがわかる。一方で等価散乱係数画像は波長の増加に従い単調に減少する波長依存性を示していることが分かる。



(a)



(b)

図2. 提案法により推定したダイズの葉の(a)吸収係数スペクトル画像と(b)等価散乱係数のスペクトル画像の一例.

図4および図5に、通常条件で栽培したサンプル (Normal) と給水停止により乾燥ストレスを与えた条件で栽培したサンプル (Dry) から得られた吸収係数スペクトル画像と等価散乱スペクトル画像の ROI 平均値を示す。給水停止2日目および4日目では、吸収係数スペクトルと等価散乱係数スペクトルに、乾燥ストレスによる影響は見られない。一方で、給水停止4日目では、等価散乱係数スペクトルの値は Normal に比べ Dry の条件で増加を示しているのが分かる。以上の結果は、給水停止4日目までの、クロロフィル量に有意な変化が見られない比較的初期の乾燥ストレス下においても、細胞・組織構造の形態変化が引き起こされていることを示唆している。このことは、本方式により得られる光散乱スペクトル画像を利用することで、乾燥ストレス応答等の植物の環境応答を非破壊かつ迅速に評価できる可能性を示している。

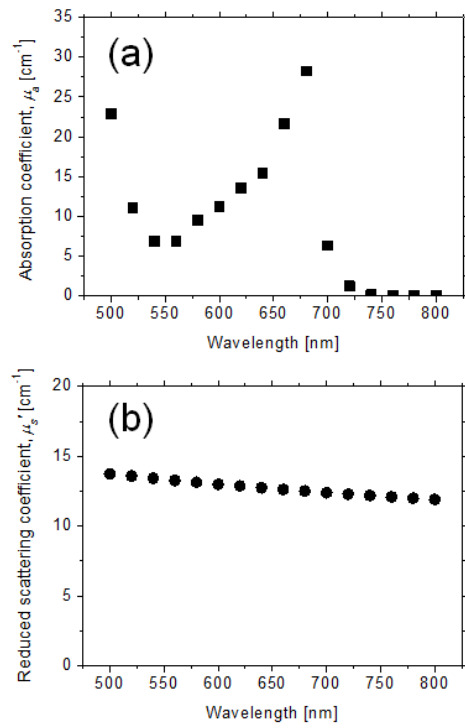


図3. 図2の画像内関心領域 ROI の領域平均値. (a)吸収係数スペクトルと(b)等価散乱係数のスペクトル.

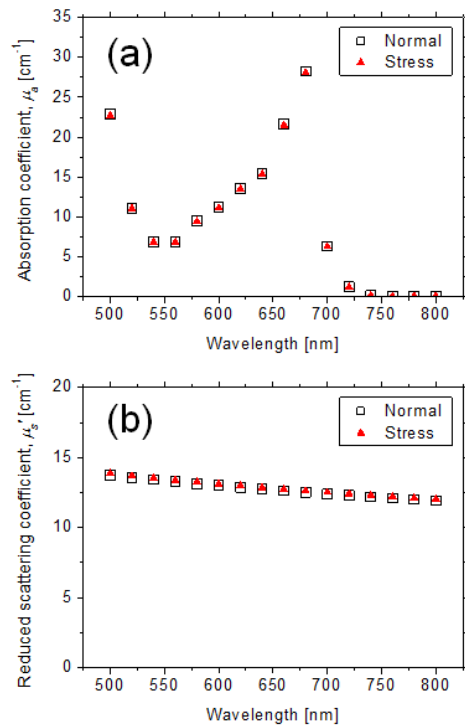


図4. 通常条件で栽培したサンプル (Normal) と給水停止後2日目の乾燥ストレス負荷サンプル通常条件で栽培したサンプル (Normal) と給水停止により乾燥ストレスを与えた条件で栽培したサンプル (Dry) から得られた(a)吸収係数スペクトルと(b)等価散乱スペクトル.

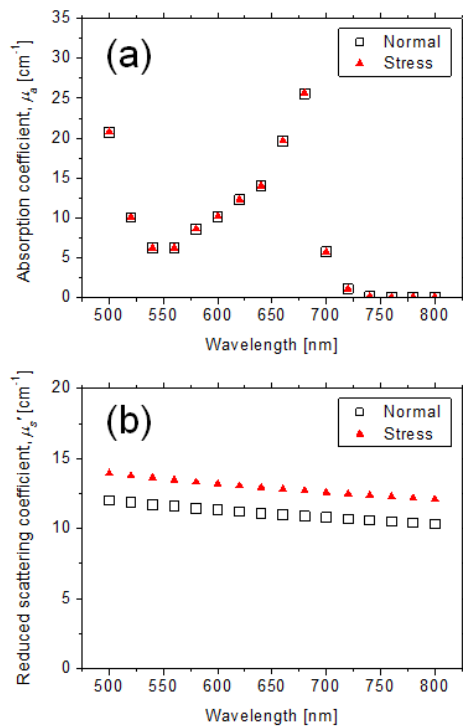


図5 .通常条件で栽培したサンプル(Normal)と給水停止後4日目の乾燥ストレス負荷サンプル(Stress)と通常条件で栽培したサンプル(Normal)と給水停止により乾燥ストレスを与えた条件で栽培したサンプル(Dry)から得られた(a)吸収係数スペクトルと(b)等価散乱スペクトル.

5 . 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計7件)

1. Akter, S., Kawauchi, S., Sato, S., Aosasa, S., Yamamoto, J., and Nishidate, I. (2017) "In vivo imaging of hepatic hemodynamics and light scattering property during ischemia-reperfusion in rats based on spectrophotometry," *Biomed. Opt. Exp.* 8: 974-992. (査読有)
2. Nishidate, I., Ishizuka, T., Mustari, A., Yoshida, K., Kawauchi, S., Sato, S., and Sato, M. (2017) "Evaluation of cerebral hemodynamics and tissue morphology of In vivo rat brain using spectral diffuse reflectance imaging," *Appl. Spectroscopy*. 71: 866-878. (査読有)
3. Saruhashi, M., Kumar-Ghosh, T., Arai, K., Ishizaki, Y., Hagiwara, K., Komatsu, K., Shiwa, Y., Umezawa, T., Sakata, Y. and Takezawa, D. (2015) "Plant Raf-like kinase integrates abscisic acid and hyperosmotic stress signaling upstream of SNF1-related protein kinase2." *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. 12(46): E6388-96. (査読有)

4. Ito, T., Kondoh, Y., Yoshida, K., Umezawa, T., Shimizu, T., Shinozaki, K. and Osada, H. (2015) "Novel abscisic acid antagonists identified with chemical array screening." *ChemBioChem* 16(17): 2471-2478. (査読有)
5. Umezawa, T. (2015) "Screening of kinase substrates using kinase-knockout mutants." *Methods in Molecular Biology* 1306: 59-69. (査読有)
6. Akter, S., Nishidate, I. et al. (2015) "Evaluation of light scattering and absorption properties of in vivo rat liver using a single-reflectance fiber probe during preischemia, ischemia-reperfusion, and postmortem." *J. Biomed. Opt.* 20: 76010. (査読有)
7. Yoshida, K., Nishidate, I. et al. (2015) "Evaluation of light scattering and absorption properties of in vivo rat liver using a single-reflectance fiber probe during preischemia, ischemia-reperfusion, and postmortem." *J. Biomed. Opt.* 20: 76010. (査読有)

[学会発表](計13件)

1. Umezawa, T. "Quest for phosphosignaling pathways in ABA response in plants." The 8th Annual Meeting of Proteomics Society, India, the 3rd AOAPO conference, New Delhi, India, Dec. 13-16, 2016. (Invited)
2. Anna Amagai, Hirofumi Nakagami, Takashi Hirayama and Taishi Umezawa "Phosphoproteomic Analysis of Abscisic Acid Signaling Components in Arabidopsis seeds", HUPO 15th World Congress, Taipei, Taiwan, Sep 18-22, 2016
3. 天谷杏奈・中神弘史・平山隆志・梅澤泰史 "シロイヌナズナ種子のリン酸化プロテオミクスを用いたPP2Cの標的タンパク質の網羅的解析" 日本植物学会、沖縄コンベンションセンター(沖縄県宜野湾市) 9月16日(2016)
4. 松岡頌子・梅澤泰史 他 "アブシシン酸応答に關与する SnRK2 プロテインキナーゼの活性調整剤の探索" 日本植物学会、沖縄コンベンションセンター(沖縄県宜野湾市) 9月16日(2016)
5. Umezawa, T. "A Phosphoproteomic Approach to Understand the Evolution of ABA Signaling Pathway in Land Plants"

The 7th International Symposium on Frontiers in Agricultural Proteome Research, the 2nd AOAPO conference, Jungwon University, Korea, Sep. 23, 2015. (Invited)

6. **Taishi Umezawa**, Yoshimasa Honda, Naoyuki Sugiyama, Jeffrey C. Anderson, Scott Peck, Daisuke Takezawa, Yoichi Sakata, Kazuo Shinozaki, "Screening of ABA-responsive SnRK2 substrates using a phosphoproteomic approach", The 57th JSPP Annual Meeting Symposium 01 "Abscisic acid signaling: Beyond the discovery of PYR/PYL/RCAR", 岩手、3月18日～20日(2016)
7. 廣谷美咲, 梅澤泰史他 "Functional analysis of MAP kinase cascade in ABA signaling" 日本植物生理学会、岩手大学(岩手県盛岡市) 3月20日(2016)
8. 石川慎之祐, 梅澤泰史他 "オオムギの休眠種子および後熟種子のリン酸化プロテオーム解析" 日本植物生理学会、岩手大学(岩手県盛岡市) 3月20日(2016)
9. 本多慶匡、梅澤泰史他 "ヒメツリガネゴケにおける ABA シグナル伝達経路のリン酸化プロテオーム解析" 日本植物生理学会、岩手大学(岩手県盛岡市) 3月20日(2016)
10. 鈴木梨沙, 梅澤泰史他 "シロイヌナズナの機能未知タンパク質 SNS1 の栄養生長期における機能解析" 日本植物生理学会、岩手大学(岩手県盛岡市) 3月20日(2016)
11. 富澤昌仁, **梅澤泰史**, **西舘泉**, "乾燥ストレス条件下における植物の光散乱・吸収特性の画像計測" 日本光学会年次学術講演会 Optics & Photonics Japan 2015, 筑波大学東京キャンパス文京校舎(東京都文京区), 10月28日～30日(2015).
12. 田村由貴・梅澤泰史 "Functional analysis of candidate proteins of ABA-activated SnRK2 substrates in Arabidopsis" 日本植物学会、朱鷺メッセ(新潟県新潟市) 9月7日(2015)
13. 本多慶匡、梅澤泰史他 "Phosphoproteomic analysis for ABA-response mutants of Physcomitrella patens" 日本植物学会、朱鷺メッセ(新潟県新潟市) 9月7日(2015)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

梅澤 泰史(UMEZAWA, Taishi)

東京農工大学・大学院農学研究院・准教授

研究者番号：70342756

(2) 研究分担者

西舘 泉(NISHIDATE, Izumi)

東京農工大学・大学院工学研究院・准教授

研究者番号：70375319